

2009 年度 修士論文要旨

超好熱菌 *Thermococcus kodakaraensis* 由来 TK1199(TIP49 ホモログ)の機能解析

関西学院大学大学院理工学研究科

生命科学専攻 藤原研究室 吉岡 幸

【研究目的】 ユーカリアには広く TBP interacting protein 49 (TIP49) というタンパク質が存在している。TIP49 とは TBP 結合因子に随伴した形で見出されたバクテリアの組み換え因子 RuvB に類似するタンパク質である。ユーカリア由来 TIP49 は ATP 依存型 DNA ヘリカーゼとして機能し、転写制御に広く関与する細胞増殖に重要な因子である。特に酵母において TIP49 は生育に必須な因子であることが知られている。いくつかのアーキアでもこの TIP49 のホモログ遺伝子を有している。しかし、アーキアにおける TIP49 ホモログの生理的役割についてはいまだ報告例はなく、その詳細は明らかになっていない。そこで、本研究では TIP49 ホモログを有するアーキア、超好熱菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 株のもつ TIP49 ホモログ、TK1199 の機能解析を行うことでアーキア由来 TIP49 ホモログの生体内での機能に関する知見を得ることを目的とした。

【実験方法】 作成した TK1199 の系統樹、TIP49 ホモログを有するアーキアの生育温度を解析することにより TK1199 の機能を推定した。RT-PCR により各温度における TK1199 の転写量解析を行った。さらに、熱ショック応答転写調節因子である *Pyrococcus* heat-shock regulator (Phr) の破壊株における TK1199 の転写量解析を行い、TK1199 の転写誘導機構を明らかにした。また TK1199 のポリクローナル抗体を作製し、TK1199 の発現動態解析を行った。一方で、組換え型 TK1199 を精製し円偏光二色性分析によってその熱安定性の評価を行った。さらに、組換え型 TK1199 の ATPase 活性測定 (60°C、70°C、80°C)、及び各種基質を用いてヘリカーゼ活性測定を行った。TK1199 遺伝子破壊株を作製し、その生育特性解析を行った。さらに、高温 (93°C) で培養した野生株と Δ TK1199 株を用いてマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析、LC-MS によるプロテオーム解析を行い、遺伝子破壊による各種遺伝子の mRNA 量、たんぱく質量への影響を調べた。高温で培養した野生株の細胞抽出液をヘパリンカラム、ゲル濾過の順に分画し、dot blotting により TK1199 が含まれる画分を特定した。その画分を LC-MS にかけることにより TK1199 の相互作用因子の同定を試みた。

【実験結果】 TK1199 の系統学的解析を行った結果、アーキアでは超好熱菌のみが TIP49 ホモログを有することが分かった。TK1199 の発現動態解析の結果、TK1199 は低温 (60°C) で Phr による転写抑制を受け、高温特異的に発現するタンパク質であることが明らかになった。 Δ TK1199 株の生育特性解析を行った結果、 Δ TK1199 株は超高温 (100°C) での熱ショックを伴う培養条件下で、生育不可となった。組換え型 TK1199 の熱安定性の評価を行った結果、60°C から変性が始まった。また、組換え型 TK1199 は 70°C で最大の ATPase 活性を示した。しかし、ヘリカーゼ活性は確認できなかった。プロテオーム解析の結果、野生株に比べて Δ TK1199 株で 23S rRNA (uracil-5-)-methyltransferase (TK2135) が顕著に減少していた。TK1199 が含まれる画分を質量分析した結果、そのなかに TBP、TFB、RNA polymerase などの転写複合体の因子は含まれていなかった。

【考察】 TIP49 ホモログをもつアーキアの生育温度は高いこと、 Δ TK1199 株が熱ショックを受けると生育不可となることからアーキア由来 TIP49 ホモログはアーキアが超高温環境に一定時間さらされた

際、アーキアの生育を支援する緊急応答の役割を担っていると考えられる。rRNA のメチル化酵素は rRNA の熱安定化に関与しているとの報告があり、TK1199 は TK2135 に相互作用しこのたんぱく質を介してアーキアを超高温環境から保護しているのではないかと予想される。また、TK1199 と同じ画分に転写複合体の因子がないこと、ヘリカーゼ活性がないことからアーキア由来 TIP49 ホモログは TBP と相互作用する DNA ヘリカーゼではないと考えられる。つまり、アーキア由来 TIP49 ホモログはユーカリア由来 TIP49 ホモログとは異なる働きをもつ因子であると考えられる。